

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3893381号  
(P3893381)

(45) 発行日 平成19年3月14日(2007.3.14)

(24) 登録日 平成18年12月15日(2006.12.15)

(51) Int. Cl. F I  
**GO 1 N 27/28 (2006.01)** GO 1 N 27/28 3 O 1 Z  
**GO 1 N 37/00 (2006.01)** GO 1 N 27/28 M  
 GO 1 N 37/00 1 O 1

請求項の数 18 (全 24 頁)

|               |                              |           |                  |
|---------------|------------------------------|-----------|------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2003-546094 (P2003-546094) | (73) 特許権者 | 000005821        |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年11月19日(2002.11.19)      |           | 松下電器産業株式会社       |
| (86) 国際出願番号   | PCT/JP2002/012085            |           | 大阪府門真市大字門真1006番地 |
| (87) 国際公開番号   | W02003/044512                | (74) 代理人  | 100077931        |
| (87) 国際公開日    | 平成15年5月30日(2003.5.30)        |           | 弁理士 前田 弘         |
| 審査請求日         | 平成16年4月27日(2004.4.27)        | (74) 代理人  | 100094134        |
| (31) 優先権主張番号  | 特願2001-353829 (P2001-353829) |           | 弁理士 小山 廣毅        |
| (32) 優先日      | 平成13年11月19日(2001.11.19)      | (74) 代理人  | 100110939        |
| (33) 優先権主張国   | 日本国(JP)                      |           | 弁理士 竹内 宏         |
|               |                              | (74) 代理人  | 100110940        |
|               |                              |           | 弁理士 嶋田 高久        |
|               |                              | (74) 代理人  | 100113262        |
|               |                              |           | 弁理士 竹内 祐二        |
|               |                              | (74) 代理人  | 100115059        |
|               |                              |           | 弁理士 今江 克実        |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体試料が発する電気信号を測定するための測定デバイスおよび測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体試料が発する電気信号を測定するための測定デバイスであって、  
 第1の方向に延びる流路と、  
 上記流路の両端に連結された1対の導入口と、  
 上記流路内に設けられた凹形状のウェルと、  
 上記流路内に設けられた基準電極と、  
 上記ウェル内に設けられた少なくとも1つの微小電極と、  
 上記ウェルに連結されており、上記第1の方向と異なる第2の方向に延びる第1連通管と、

上記ウェルのうちの、上記第1連通管と異なる部分に連結されており、上記第1の方向および第2の方向のいずれとも異なる第3の方向に延びる第2連通管と、

上記第1および第2連通管のそれぞれに接続された第1および第2抵抗槽と、

上記第1および第2連通管または上記第1および第2抵抗槽に配置された第1および第2抗体とを備える測定デバイス。

【請求項2】

請求項1に記載の測定デバイスにおいて、

上記第1連通管と上記第2連通管とは、上記流路を対称軸として線対称に配置されていることを特徴とする測定デバイス。

【請求項3】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

上記第 1 連通管および上記第 2 連通管は、上記第 1 連通管に沿って延びる直線と、上記第 2 連通管に沿って延びる直線とが上記少なくとも 1 つの微小電極に向かって交差するように配置されていることを特徴とする測定デバイス。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

上記少なくとも 1 つの微小電極は、突起状の先端部を有することを特徴とする測定デバイス。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

上記少なくとも 1 つの微小電極は、複数の微小電極であることを特徴とする測定デバイス。

10

【請求項 6】

請求項 5 に記載の測定デバイスにおいて、

上記基準電極の表面積は、上記複数の微小電極の表面積の合計よりも大きいことを特徴とする測定デバイス。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

第 1 基板と、上記第 1 基板上に設けられた第 2 基板とをさらに備え、  
 上記第 1 基板は、上記ウェルと、上記基準電極と、上記微小電極と、上記第 1 および第 2 連通管と、第 1 および第 2 抵抗槽と、第 1 および第 2 抵抗体とを有し、  
 上記第 2 基板は、上記第 1 基板上に設けられた状態で上記流路となる、上記第 1 の方向に延びる凹部と、上記第 1 基板上に設けられた状態で上記 1 対の導入口となる、上記凹部の両端に形成された空洞とを有することを特徴とする測定デバイス。

20

【請求項 8】

請求項 7 に記載の測定デバイスにおいて、

上記第 2 基板は、透明の材料から形成されていることを特徴とする測定デバイス。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の測定デバイスにおいて、

上記第 1 基板は、半導体材料から形成されていることを特徴とする測定デバイス。

30

【請求項 10】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

上記第 1 連通管の体積は、上記第 1 抵抗槽の体積の  $1/5$  未満であり、

上記第 2 連通管の体積は、上記第 2 抵抗槽の体積の  $1/5$  未満であることを特徴とする測定デバイス。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

上記流路の表面は、親水性処理が施されていることを特徴とする測定デバイス。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

上記第 1 および第 2 抵抗体は、くし型形状であることを特徴とする測定デバイス。

40

【請求項 13】

請求項 3 に記載の測定デバイスにおいて、

上記ウェルのうちの、上記第 1 および第 2 連通管と異なる部分に連結されており、上記第 2 の方向および上記第 3 の方向のいずれとも異なる第 4 の方向に延びる第 3 連通管と、

上記第 3 連通管に接続された第 3 抵抗槽と、

上記第 3 連通管または上記第 3 抵抗槽に配置された第 3 抵抗体とをさらに備えることを特徴とする測定デバイス。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の測定デバイスにおいて、

50

上記第 1 連通管および上記第 2 連通管は、上記第 1 連通管に沿って延びる直線と、上記第 2 連通管に沿って延びる直線とが上記少なくとも 1 つの微小電極に向かって開くように配置されており、

上記第 3 連通管は、上記少なくとも 1 つの微小電極の先端部が上記第 3 連通管に沿って延びる直線上に実質的に位置するように配置されていることを特徴とする測定デバイス。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の測定デバイスにおいて、

上記第 1 の方向に延びるもう 1 つの流路と、

上記もう 1 つの流路の両端に連結されたもう 1 対の導入口と、

上記もう 1 つの流路内に設けられた凹形状のもう 1 つのウェルと、

上記もう 1 つの流路内に設けられたもう 1 つの基準電極と、

上記もう 1 つのウェル内に設けられた少なくとも 1 つのもう 1 つの微小電極と、

上記もう 1 つのウェルに連結されており、上記第 1 の方向と異なる第 2 の方向に延びるもう 1 つの第 1 連通管と、

上記もう 1 つのウェルのうちの、上記もう 1 つの第 1 連通管と異なる部分に連結されており、上記第 1 の方向および第 2 の方向のいずれとも異なる第 3 の方向に延びるもう 1 つの第 2 連通管と、

上記もう 1 つの第 1 および第 2 連通管のそれぞれに接続されたもう 1 つの第 1 および第 2 抵抗槽と、

上記もう 1 つの第 1 および第 2 連通管または上記もう 1 つの第 1 および第 2 抵抗槽に配置されたもう 1 つの第 1 および第 2 抵抗体とをさらに備えることを特徴とする測定デバイス。

【請求項 16】

生体試料が発する電気信号を測定する測定方法であって、

第 1 の方向に延びる流路と、上記流路の両端に連結された 1 対の導入口と、上記流路内に設けられた凹形状のウェルと、上記流路内に設けられた基準電極と、上記ウェル内に設けられた少なくとも 1 つの微小電極と、上記ウェルに連結されており、上記第 1 の方向と異なる第 2 の方向に延びる第 1 連通管と、上記ウェルのうちの、上記第 1 連通管と異なる部分に連結されており、上記第 1 の方向および第 2 の方向のいずれとも異なる第 3 の方向に延びる第 2 連通管と、上記第 1 および第 2 連通管のそれぞれに接続された第 1 および第 2 抵抗槽と、上記第 1 および第 2 連通管または上記第 1 および第 2 抵抗槽に配置された第 1 および第 2 抵抗体とを備える測定デバイスを用意する工程 ( a ) と、

上記流路内の圧力を低減することによって上記流路に電解質溶液を導入して充填する工程 ( b ) と、

上記流路内の圧力を大気圧に戻す工程 ( c ) と、

上記ウェル内に生体試料を配置する工程 ( d ) と、

上記流路を密閉する工程 ( e ) と、

上記第 1 抵抗体または第 2 抵抗体に電流を印加することによって、上記少なくとも 1 つの微小電極に上記生体試料を接触させる工程 ( f ) と、

上記生体試料が発する電気信号の変化を測定する工程 ( g ) と、

を含む測定方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の測定方法において、

上記工程 ( f ) の後に、上記少なくとも 1 つの微小電極に電気パルス印加する工程 ( h ) をさらに含むことを特徴とする測定方法。

【請求項 18】

請求項 16 または 17 に記載の測定方法において、

上記 1 対の導入口のいずれか一方から薬剤を投入する工程 ( i ) をさらに含むことを特徴とする測定方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、生体試料の電気生理学的評価を行なうための測定デバイスに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来、生体試料（代表的には細胞）を用いる薬品スクリーニング手法では、蛍光色素法または微小ピペット電極法によって細胞の活動をモニターし、細胞に対する薬品の影響、作用などを評価している。

## 【0003】

蛍光色素法は、種々のイオン濃度に特異的に感応する蛍光色素や、膜電位感受性の蛍光色素などを用いて、薬品の影響を受ける細胞の活動を、細胞の膜電位変化やイオン濃度変化にともなう蛍光の変化の度合いを光学的に測定する方法である。蛍光色素法では、細胞を色素で染色する工程を必要とするため、細胞に対する色素の影響をなくすることはできない。また、蛍光色素法では、蛍光色素からの蛍光が時間の経過と共に弱くなるため、検出精度に乏しいという欠点がある。

10

## 【0004】

これに対し、微小ピペット電極法は、細胞内の電位、細胞膜に存在するイオンチャネル電流、薬剤受容体作動性チャネル電流などの、細胞の電氣的活動を直接測定する方法である。このため、薬品の影響を受ける細胞の活動のより詳細かつ広範な情報を得ることができる。微小ピペット電極法は、細胞の活動情報を得るために非常に有用な方法である。

20

## 【0005】

一般に、微小ピペット電極法の1つである細胞内電位記録法では、細胞内の電位を計測するために、熱融解した石英ガラスもしくはホウケイ酸ガラスを引っ張り加工して、先端直径がサブミクロン単位に製作された微小ピペットを、細胞内に刺入する。また、微小ピペット電極法の1つであるパッチクランプ法では、細胞の0.1～20ミクロン程度の微小領域を局所的に測定するために、微小ピペットを細胞膜に押しつけ、微小ピペットと細胞膜とを所定の角度で高精度に密着させる。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

しかしながら、従来の微小ピペット電極法では、技術者が顕微鏡像を頼りにしながら微小ピペットを操作することによって、基板上に固定された細胞に微小ピペットを刺入する、あるいは密着させている。このため、微小ピペットの高精度な位置制御装置を必要とし、さらには細胞に微小ピペットを刺入する、あるいは密着させるためには熟練が必要である。

30

## 【0007】

従って、微小ピペット電極法は、大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングする手法としては適していないという不具合がある。

## 【0008】

特開平9-289886号公報には、微小ピペット電極法に用いる細胞膜電位検出装置が開示されている。この細胞膜電位検出装置は、複数の有底穴をもつシャーレの底面に設けられた、微小ピペットの役割を果たす細胞刺入用の突起電極と、有底穴の側面周囲に設けられた基準電極とを備えている。

40

## 【0009】

上記公報に開示されている細胞膜電位検出装置にも、やはり、細胞を突起電極に正確に誘導する手段が設けられていない。このため、細胞を突起電極に誘導する操作に技術者の熟練が必要となる不具合がある。

## 【0010】

本発明は、上記不具合に鑑みてなされたものであり、簡易で、正確、高速かつ自動的に、生体試料の電気生理学的測定を行なうことが可能な測定デバイスを提供することを目的

50

とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の測定デバイスは、生体試料が発する電気信号を測定するための測定デバイスであって、第1の方向に延びる流路と、上記流路の両端に連結された1対の導入口と、上記流路内に設けられた凹形状のウェルと、上記流路内に設けられた基準電極と、上記ウェル内に設けられた少なくとも1つの微小電極と、上記ウェルに連結されており、上記第1の方向と異なる第2の方向に延びる第1連通管と、上記ウェルのうちの、上記第1連通管と異なる部分に連結されており、上記第1の方向および第2の方向のいずれとも異なる第3の方向に延びる第2連通管と、上記第1および第2連通管のそれぞれに接続された第1および第2抵抗槽と、上記第1および第2連通管または上記第1および第2抵抗槽に配置された第1および第2抵抗体とを備える。

10

【0012】

本発明の測定デバイスにおいて、第1および第2抵抗体に電流が印加されると、第1および第2抵抗体は電気エネルギーを消費し熱を発生する。流路に電解質溶液を満たし、第1および第2抵抗槽に電解質溶液との界面張力に変化を生じさせることが可能な媒体を充填した状態で使用し、それぞれの抵抗体に異なる電流値で電流を印加する。このことにより、第1および第2抵抗槽に閉じ込められた媒体と、第1および第2連通管に満たされた電解質溶液との間の界面張力が抵抗体で発生する熱量に比例して減少する。その結果、第1および第2連通管内の電解質溶液が、高温側の抵抗槽から低温側の抵抗槽に向かって移動する。このことによって、ウェル内に電解質溶液の局所的流れが生じ、この局所的流れを利用して、生体試料を微小電極に正確で且つ迅速に誘導し、生体試料の電気生理学的測定を行なうことができる。従って、本発明の測定デバイスによれば、従来この種の装置では必要であった高精度な位置制御装置、および熟練した操作も不要である。

20

【0013】

上記第1連通管と上記第2連通管とは、上記流路を対称軸として線対称に配置されていることが好ましい。

【0014】

このことによって、第1および第2連通管内にある電解質溶液の局所的流れによって誘導される生体試料の誘導方向および誘導速度の計算を非常に単純化することができる。

30

【0015】

上記少なくとも1つの微小電極は、突起状の先端部を有することが好ましい。

【0016】

このことによって、生体試料に微小電極を刺入することが可能になる。

【0017】

上記第1連通管および上記第2連通管は、上記第1連通管に沿って延びる直線と、上記第2連通管に沿って延びる直線とが上記少なくとも1つの微小電極に向かって交差するように配置されていることが好ましい。

【0018】

このことによって、ウェル内に生じる電解質溶液の局所的流れを微小電極に向かう方向に生じさせることができる。

40

【0019】

上記少なくとも1つの微小電極は、複数の微小電極である構成としてもよい。

【0020】

このことによって、複数の生体試料をそれぞれの微小電極に固定し、全ての生体試料を同時に測定することも、各生体試料を別々に測定することも可能となる。

【0021】

上記基準電極の表面積は、上記複数の微小電極の表面積の合計よりも大きいことが好ましい。

【0022】

50

このことによって、溶液流れなどの外乱に対する測定の安定性が向上する。

【0023】

第1基板と、上記第1基板上に設けられた第2基板とをさらに備え、上記第1基板は、上記ウェルと、上記基準電極と、上記微小電極と、上記第1および第2連通管と、第1および第2抵抗槽と、第1および第2抵抗体とを有し、上記第2基板は、上記第1基板上に設けられた状態で上記流路となる、上記第1の方向に延びる凹部と、上記第1基板上に設けられた状態で上記1対の導入口となる、上記凹部の両端に形成された空洞とを有する構成としてもよい。

【0024】

上記第2基板は、透明の材料から形成されていることが好ましい。

10

【0025】

このことによって、流路を外部から観察することが可能になる。

【0026】

上記第1基板は、半導体材料から形成されていることが好ましい。

【0027】

このことによって、第1および第2抵抗槽、ならびに第1および第2連通管を、当業者に公知の半導体製造技術を用いて作製することができる。特にウェットエッチングを用いることによって、面方位選択性を利用して、第1および第2抵抗槽、ならびに第1および第2連通管を高精度で形成することが可能である。

【0028】

上記第1連通管の体積は、上記第1抵抗槽の体積の1/5未満であり、上記第2連通管の体積は、上記第2抵抗槽の体積の1/5未満であることが好ましい。

20

【0029】

このことによって、第1および第2抵抗槽の界面張力を適宜調節することによって、電解質溶液の界面が第1および第2連通管の所望の位置に存在するように制御することが容易になる。

【0030】

上記流路の表面は、親水性処理が施されていることが好ましい。

【0031】

このことによって、微小な流路内に液体を流すことができる。

30

【0032】

上記第1および第2抵抗体は、くし型形状であることが好ましい。

【0033】

このことによって、狭い領域でも第1および第2抵抗体の長さを大きくでき、抵抗値を大きくすることが可能となる。

【0034】

上記ウェルのうちの、上記第1および第2連通管と異なる部分に連結されており、上記第2の方向および上記第3の方向のいずれとも異なる第4の方向に延びる第3連通管と、上記第3連通管に接続された第3抵抗槽と、上記第3連通管または上記第3抵抗槽に配置された第3抵抗体とをさらに備えることが好ましい。

40

【0035】

このことによって、電解質溶液内に含まれる生体試料の位置制御を自由に行なうことができる。さらに、電解質溶液内に含まれる生体試料の位置制御の自由度が高くなるので、微小電極をウェル内に自由に設けることができる。つまり、ウェル内の設計の自由度が向上する。

【0036】

上記第1連通管および上記第2連通管は、上記第1連通管に沿って延びる直線と、上記第2連通管に沿って延びる直線とが上記少なくとも1つの微小電極に向かって開くように配置されており、上記第3連通管は、上記少なくとも1つの微小電極の先端部が上記第3連通管に沿って延びる直線上に実質的に位置するように配置されていることが好ましい。

50

## 【0037】

このことによって、ウェル内において、電解質溶液の局所的流れを微小電極に対して前後、左右方向のいずれの方向にも自由に生じさせることが可能である。

## 【0038】

上記第1の方向に延びるもう1つの流路と、上記もう1つの流路の両端に連結されたもう1対の導入口と、上記もう1つの流路内に設けられた凹形状のもう1つのウェルと、上記もう1つの流路内に設けられたもう1つの基準電極と、上記もう1つのウェル内に設けられた少なくとも1つのもう1つの微小電極と、上記もう1つのウェルに連結されており、上記第1の方向と異なる第2の方向に延びるもう1つの第1連通管と、上記もう1つのウェルのうちの、上記もう1つの第1連通管と異なる部分に連結されており、上記第1の方向および第2の方向のいずれとも異なる第3の方向に延びるもう1つの第2連通管と、上記もう1つの第1および第2連通管のそれぞれに接続されたもう1つの第1および第2抵抗槽と、上記もう1つの第1および第2連通管または上記もう1つの第1および第2抵抗槽に配置されたもう1つの第1および第2抵抗体とをさらに備える構成としてもよい。

10

## 【0039】

このことによって、同時に複数の測定を行なうことが可能である。

## 【0040】

本発明の測定方法は、生体試料が発する電気信号を測定する測定方法であって、第1の方向に延びる流路と、上記流路の両端に連結された1対の導入口と、上記流路内に設けられた凹形状のウェルと、上記流路内に設けられた基準電極と、上記ウェル内に設けられた少なくとも1つの微小電極と、上記ウェルに連結されており、上記第1の方向と異なる第2の方向に延びる第1連通管と、上記ウェルのうちの、上記第1連通管と異なる部分に連結されており、上記第1の方向および第2の方向のいずれとも異なる第3の方向に延びる第2連通管と、上記第1および第2連通管のそれぞれに接続された第1および第2抵抗槽と、上記第1および第2連通管または上記第1および第2抵抗槽に配置された第1および第2抵抗体とを備える測定デバイスを用意する工程(a)と、上記流路内の圧力を低減することによって上記流路に電解質溶液を充填する工程(b)と、上記流路内の圧力を大気圧に戻す工程(c)と、上記ウェル内に生体試料を配置する工程(d)と、上記流路を密閉する工程(e)と、上記第1抵抗体または第2抵抗体に電流を印加することによって、上記少なくとも1つの微小電極に上記生体試料を接触させる工程(f)と、上記生体試料が発する電気信号の変化を測定する工程(g)とを含む。

20

30

## 【0041】

本発明の測定方法によれば、電極に誘導された生体試料の電気生理学的測定を行なう際に、従来では必要であった高精度な位置制御装置、および熟練した操作が不要となる。つまり、簡易で、正確、高速かつ自動的に、生体試料の電気生理学的測定を行なうことができる。

## 【0042】

上記工程(f)の後に、上記少なくとも1つの微小電極に電気パルスを印加する工程(h)をさらに含む構成としてもよい。

## 【0043】

このことによって、生体試料の電気刺激による電気的な反応を高感度で測定することができる。

40

## 【0044】

上記1対の導入口のいずれか一方から薬剤を投入する工程(i)をさらに含む構成としてもよい。

## 【0045】

このことによって、生体試料の薬剤に対する電気的な反応の測定を簡便に行なうことができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0046】

50

以下、本発明の実施形態を図面を参照しながら説明する。

【0047】

(実施形態1)

図1は、本実施形態の測定デバイスの構成を示す図である。図2は、図1中に示したII-III線に沿った断面図である。

【0048】

図1に示すように、本実施形態の測定デバイス10は、測定セル11と、電流印加部18と、ポンプ31および32と、測定部33と、撮像部34と、計算機35とを備えている。

【0049】

測定セル11は、基板17と、基板17上に設けられた基板16とを備えている。基板16と基板17とは互いに貼り合わせられている。基板17には、図1に示すように、端子4a、4b、5aおよび5bが設けられている。

【0050】

電流印加部18は、図1に示すように、基板17に設けられた端子5aおよび5bに電氣的に接続されている。

【0051】

ポンプ31および32は、図1に示すように、入口コネクタ13および出口コネクタ14に設けられた開口部13aおよび14aにそれぞれ接続されている。

【0052】

測定部33は、端子4aおよび4bに接続されており、計算機35は、測定部33に電氣的に接続されている。

【0053】

撮像部34は、測定セル11の直上に位置するように配置されている。図1に示すように、必要に応じて、撮像部34および電流印加部18は、計算機35に電氣的に接続される。

【0054】

次に、測定セル11のより詳細な構造を説明する。

【0055】

図1に示すように、測定セルを構成している基板16の上には、入口コネクタ13と、出口コネクタ14とが設けられている。本実施形態では、図1および図2に示すように、入口コネクタ13および出口コネクタ14は、接着剤などによって基板16に接着しているが、これに限定されず、基板16と一体成形されていてもよい。また、図2に示すように、入口コネクタ13および出口コネクタ14の内部は空洞7および8になっており、この空洞7および8は、基板16を貫通している。さらに、入口コネクタ13および出口コネクタ14の上にはそれぞれ開口部13aおよび14aが設けられており、入口コネクタ13および出口コネクタ14の内部の空洞7および8は、開口部13aおよび14aからチューブ等によりポンプ31および32にそれぞれ通じている。入口コネクタ13および出口コネクタ14の内部の空洞7および8は、バルブVを介してポンプ31および32にそれぞれ連結されている。

【0056】

また、図2に示すように、基板16には、凹部9aが形成されている。このため、基板16と基板17とが互いに貼り合わされることによって測定セル11が構成されたときに、測定セル11内に流路9が形成される。

【0057】

基板17は、図2に示すように、凹形状のウェル19と、ウェル19の側壁面上に設けられた突起状の微小電極1とを備える。

【0058】

ここで、測定セル11のより詳細な構造を図1および図2に加えて、図3を参照しながら説明する。図3は、図1中に示した矢印Aから見た測定セル11の透視図である。なお

10

20

30

40

50

、図3中に示すIII-III線に沿った断面図は、図1と同様に、図2の断面図に相当する。また、図3では、測定セル11のうちの基板16の図示を省略している。

【0059】

図2および図3に示すように、基板16は、空洞7および8が流路9の両端の上に位置するように基板17に貼り合わせられている。

【0060】

図3に示すように、測定セル11の基板17には、凹形状のウェル19と、端子4aに接続され、ウェル19の側壁面上に設けられた突起状の微小電極1と、ウェル19（すなわち流路9）の両側面に対向して接続された連通管15aおよび15bと、連通管15aおよび15bにそれぞれ接続されている抵抗槽6aおよび6bと、抵抗槽6aおよび6b内にそれぞれ配置された薄膜抵抗体3aおよび3bと、端子4bに接続された基準電極2とが設けられている。

10

【0061】

連通管15aおよび15bは、流路9（すなわちウェル19）を対称軸としてほぼ線対称に配置されている。また、連通管15aおよび連通管15bは、図3に示すように、連通管15aおよび連通管15bがそれぞれ流路9（すなわちウェル19）に対してなす角度を $\theta$ とすると、 $\theta$ は必ず鈍角になるように配置されている。つまり、連通管15aに沿って延びる直線と、連通管15bに沿って延びる直線とが微小電極1に向かって交差するように、連通管15aおよび連通管15bが配置されている。

【0062】

また、本実施形態では、抵抗槽6aおよび6b、ならびに薄膜抵抗体3aおよび3bもまた、連通管15aおよび15bと同様に流路9（すなわちウェル19）を対称軸としてほぼ線対称に配置されている。

20

【0063】

連通管15aおよび15bは、抵抗槽6aおよび6bに比べて非常に小さな断面積を有する。抵抗槽6aおよび6bは任意の形状であり得る。

【0064】

基準電極2は、基板16に形成された流路9の入口7の近傍に配置されている。なお、基準電極2は、液体と接する位置に存在すればよく、流路9およびウェル19内に配置されることが好ましい。よって、基板17上に作製することも可能である。但し、作製の容易さから基板16に設けることが好ましい。

30

【0065】

図1および図3に示すように、微小電極1および基準電極2は、端子4aおよび4bを通じて測定部33に接続される。測定部33としては、微小ピペット電極法では、ブリッジバランス回路、電流刺激用回路、および細胞膜容量の容量補正機構を備える電流・電圧増幅器等が好適に用いられる。

【0066】

図1および図3に示すように、薄膜抵抗体3aおよび3bは、端子5aおよび5bを通じて、電流印加部18にそれぞれ接続されている。電流印加部18は、薄膜抵抗体3aおよび3bに所望の電流を印加する。

40

【0067】

基板17としては、シリコン基板等からなる半導体基板を用いることが好ましい。基板17として、半導体基板を用いることによって、抵抗槽6aおよび6b、ならびに連通管15aおよび15bを、当業者に公知の半導体製造技術を用いて作製することができる。特にウェットエッチングによって抵抗槽6aおよび6b、ならびに連通管15aおよび15bを作製することが好ましい。ウェットエッチングを用いれば、面方位選択性を利用して、高精度で微細な構造が形成された基板17（すなわち測定セル）が得られるからである。

【0068】

なお、ドライエッチングまたはウェットエッチングのいずれを用いても上記抵抗槽およ

50

び連通管を作製することができる。ウェットエッチングを行なう場合に用いるエッチャントとしては、等方性を有するエッチャント、または異方性を有するエッチャントが必要に応じて選択されて用いられる。

**【 0 0 6 9 】**

基板 1 6 としては、撮像部 3 4 から流路 9 を観察することができるように、透明の基板が用いられることが好ましい。基板 1 6 に設けられる入口コネクタ 1 3 および出口コネクタ 1 4 の空洞 7 および 8、ならびに流路 9 は、当業者に公知の加工技術（特に切削加工または研削加工など）、あるいは半導体製造技術を用いて作製され得る。特に基板 1 6 としては、ガラス基板を用いることが好ましい。このことによって、当業者に公知の半導体製造技術を用いて基板 1 6 に設けられる入口コネクタ 1 3 および出口コネクタ 1 4 の空洞 7 および 8、ならびに凹部 9 a を高精度で作製することが可能になる。

10

**【 0 0 7 0 】**

微小電極 1 は、導電性材料で形成されている。特に、本実施形態では、微小電極 1 は、単結晶シリコンをアンダーエッチング技術により微小突起の形状とし、このシリコン微小突起の表面に金属薄膜を被覆し、さらにその先端部位を除いて絶縁物で被覆することによって形成されている。このため、微小電極 1 は、先端直径が 0 . 1  $\mu$ m 程度の鋭利な突起状となっている。

**【 0 0 7 1 】**

本実施形態では、基準電極 2、端子 4 a、4 b、5 a および 5 b、微小電極 1 と端子 4 a とを接続する配線、基準電極 2 と端子 4 b とを接続する配線、薄膜抵抗体 3 a および 3 b は、真空蒸着、スパッタなどの薄膜形成技術を用いて作製されている。しかしながら、これらに限定されず、当業者に公知の方法を用いて作製しても全く構わない。

20

**【 0 0 7 2 】**

次に、本実施形態の測定デバイス 1 1 の溶液導入法を図 4 を参照しながら説明する。

**【 0 0 7 3 】**

図 4 ( a )、( b ) および ( c ) は、本実施形態の測定デバイス 1 1 の溶液導入法を模式的に示す図である。

**【 0 0 7 4 】**

まず、デバイスの流路 9 の入口 8 のコネクタに連結するバルブ V を閉め、次いで流路 9 の出口となる空洞 8 ( すなわち出口コネクタ 1 4 ) に連結されたポンプ 3 2 で吸引し、流路 9、連通管 1 5 a および 1 5 b、および抵抗槽 6 a および 6 b のそれぞれの内部の圧力を大気圧 P 1 よりわずかに低い圧力 P d まで減圧する。次いで、バルブ V を大気に開放すると、図 4 ( a ) に示すように、バルブ V に連結されたポンプ 3 1 から空洞 7 ( すなわち入口コネクタ 1 3 ) を介して電解質溶液 1 2 が流路 9 内に注入される。

30

**【 0 0 7 5 】**

このとき、連通管 1 5 a および 1 5 b を介して流路 9 に連絡している抵抗槽 6 a および 6 b 内の圧力もまた大気圧 P 1 より小さい圧力 P d となっている。従って、流路 9 に注入された電解質溶液 1 2 は、図 4 ( b ) に示すように、ウェル 1 9 を満たして出口となる空洞 8 ( すなわち出口コネクタ 1 4 ) に向かうとともに、連通管 1 5 a および 1 5 b を満たす。

40

**【 0 0 7 6 】**

次いで、電解質溶液 1 2 が流路 9 の出口となる空洞 8 に達したとき、出口コネクタ 1 4 に連結されたポンプ 3 2 の吸引を停止する。この後、出口となる空洞 8 をバルブ操作などによって大気に開放し、流路 9 内の圧力を大気圧 P 1 に戻す。ここで、抵抗槽 6 a および 6 b 内の圧力がほぼ P d のままである。このため、連通管 1 5 a および 1 5 b を満たしていた電解質溶液 1 2 は、抵抗槽 6 a および 6 b に向かって流れ込む。抵抗槽 6 a および 6 b 内の圧力が P 1 に等しくなったときに、図 4 ( c ) に示すように停止する。ここで、電解質溶液 1 2 の注入を停止し、入口となる空洞 7 ( すなわち入口コネクタ 1 3 ) に連結されたバルブ V を閉鎖する。

**【 0 0 7 7 】**

50

次に、電解質溶液 1 2 に生体試料 2 1 (本実施形態では細胞) を導入する。本実施形態では、生体試料 2 1 の導入の際に、流路 9 の形状から得られる特性を利用する。

【0078】

流路 9 は、図 2 に示すように、高さ方向の幅が非常に微細な空間である。このような微細な空間に液体が満たされた状態で、更に後から液体が流入する際には、後から導入された液体が層流となって流れやすいという特性がある。流路 9 内を流れる液体が層流となって流れると、流れる液体はウェル 1 9 の内部に満たされた液体とはほとんど混合せずに、ウェル 1 9 の上方を通過する。本実施形態では、電解質溶液 1 2 が満たされた流路 9 内に、バルブ V に連結されたポンプ 3 1 から空洞 7 (すなわち入口コネクタ 1 3) を介して生体試料 2 1 を含む試料溶液を注入する。このとき、生体試料 2 1 をモニターしながら、生体試料 2 1 がウェル 1 9 の上方に到達したときに、試料溶液の注入を停止する。このこと  
10

【0079】

なお、ここでは、生体試料 2 1 の導入について説明しているが、これに限定されず、薬剤などの導入および除去も全く同様に行なうことができる。

【0080】

最終的に、図 5 に示すように、流路 9、ウェル 1 9、連通管 1 5 a および 1 5 b が電解質溶液 1 2 で満たされた状態となる。

【0081】

なお、本実施形態では、電解質溶液 1 2 として、生体試料 2 1 である細胞の細胞内電位を測定するための細胞外液を用いている。細胞外液としては、20 mM ~ 400 mM の NaCl を主成分とする生理食塩水、および種々の栄養素、成長因子、抗生物質などを含有する培地などが用いられる。  
20

【0082】

特に、本実施形態の測定デバイス 1 0 では、抵抗槽 6 a および 6 b のそれぞれの体積を、連通管 1 5 a および 1 5 b のそれぞれの体積、またはウェル 1 9 の体積に比べてかなり大きくなるように設計されている。このため、抵抗槽 6 a および 6 b の内部の圧力を適宜調節することによって、気液界面が連通管 1 5 a および 1 5 b の所望の位置に存在するように制御することが容易になる。特に、抵抗槽 6 a および 6 b のそれぞれの体積は、連通管 1 5 a および 1 5 b のそれぞれの体積の 5 倍以上であることが好ましい。  
30

【0083】

次に、本実施形態の測定デバイス 1 0 において、細胞を電極に導く原理の概略を図 6 を参照しながら説明する。図 6 (a) および (b) は、細胞を電極に導く原理の概略を示す模式図である。ここでは、測定デバイス 1 0 の抵抗槽 6 b に配置された薄膜抵抗体 3 b に電流を印加する場合を例示的に説明する。

【0084】

まず、電流印加部 1 8 から薄膜抵抗体 3 b に電流を印加すると、薄膜抵抗体 3 b では、以下の式 1 で示される電気エネルギー W が消費される。

【0085】

$$W = R I^2 \quad (1)$$

(ここで、R は薄膜抵抗体 3 b の抵抗値 [  $\Omega \cdot m$  ]、I は薄膜抵抗体 3 b に流れた電流 [ A ] である。)

消費された電気エネルギー W は熱エネルギーとなって、これが、抵抗槽 6 b 内の空気を膨張させる。このことによって、図 6 (a) に示すように、抵抗槽 6 b 内の圧力を P d d にするとともに、これに連通する連通管 1 5 b の気液界面の界面張力を減少させる。流路 9 の出口となる空洞 8 における気液界面の界面張力は変化していないので、連通管 1 5 b にある気液界面と連通管 1 5 a にある気液界面との間の界面張力の平衡が崩れ、電解質溶液 1 2 は、抵抗槽 6 b からウェル 1 9 に向かって、図 6 (a) の矢印 B で示される方向 (低温の抵抗槽の側) に移動する。生体試料 2 1 は、電解質溶液 1 2 のこの流れに従って移  
40  
50

動し、微小電極 1 に誘導され、刺入される。

【0086】

次に、抵抗槽 6 b への電流供給を停止すると、加熱された抵抗槽 6 b 中の空気の一部は周囲温度に戻り、抵抗槽 6 b 内の圧力は  $P d d'$  となる。ここで、再び界面張力が釣り合うようになって、生体試料 2 1 は、図 6 ( b ) に示すように、移動した位置に保持される。連通管 1 5 b の体積は非常に小さく、それに含まれる電解質溶液 1 2 の熱容量が小さいので、電解質溶液 1 2 の移動は迅速である。

【0087】

本実施形態では、細胞活動測定時に入口となる空洞 7 および出口となる空洞 8 を閉じているので、電解質溶液 1 2 が連通管 1 5 b を移動する距離  $x$  (  $\mu\text{m}$  ) は、連通管 1 5 a 内にある気液界面の界面張力と、連通管 1 5 b 内にある気液界面に働く界面張力との差に比例する。従って、薄膜抵抗槽 3 b に印加される電流値  $I b$  および電流変化速度  $I b$  (  $A/s$  ) を制御するか、または、薄膜抵抗槽 3 a および 3 b にそれぞれ印加される電流値  $I a$  および  $I b$  の差、および電流変化速度  $I a$  および  $I b$  の差を制御することによって、上記の界面張力の差を調節し、連通管 1 5 b 内の気液界面の移動距離  $x$  (  $\mu\text{m}$  ) およびその移動速度  $x$  (  $\mu\text{m}/s$  ) を調節する。

【0088】

ここでは、連通管 1 5 b 内の気液界面を移動させる場合を説明したが、勿論、連通管 1 5 a 内の気液界面を移動させる場合も全く同様である。

【0089】

本実施形態では、細胞に代表される生体試料 2 1 の画像をモニターしながら、生体試料 2 1 の位置をフィードバック制御する。生体試料 2 1 の画像を、透明な基板 1 6 を通して撮像部 3 4 (例えば CCD など) によりデジタル変換して計算機 3 5 に入力し、生体試料 2 1 の移動量などの画像情報を元に、各薄膜抵抗槽 3 a および 3 b に流す電流量を算出する。算出した電流値を自動的に電流印加部 1 8 に印加する手段をさらに備えてもよい。勿論、上記の操作を、技術者が手動で全て行なっても構わないが、上記の操作を自動化することによって、より測定を簡単に行なうことが可能である。

【0090】

以上に述べたように、本実施形態の測定デバイス 1 0 では、薄膜抵抗槽 3 a および 3 b に印加される電流値  $I a$ 、 $I b$  および電流変化速度  $I a$  および  $I b$  (  $A/s$  ) を制御することによって、抵抗槽 6 a および 6 b (あるいは連通管 1 5 a および 1 5 b) 内にある気液界面に働くそれぞれの界面張力の差を調節し、連通管 1 5 a および 1 5 b 内の気液界面の移動距離およびその移動速度を調節する。

【0091】

このため、本実施形態の測定デバイス 1 0 では、ウェル 1 9 内に電解質溶液 1 2 の局所的流れを生じさせ、この局所的流れを利用して、生体試料 2 1 を微小電極 1 に正確で且つ迅速に誘導し、生体試料 2 1 の電気生理学的測定を行なうことができる。従って、従来のこの種の装置では必要であった高精度な位置制御装置、および熟練した操作も必要としない。

【0092】

また、本実施形態の測定デバイス 1 0 は、ウェル 1 9 内の細胞 2 1 に、神経刺激物質や化学シナプス情報伝達物質などの化学物質を投与することが可能であるため、薬剤の投与による細胞のイオンチャネル特性や化学シナプスを測定する細胞内記録法と同様の高精度の測定を簡便に行なうことができる。

【0093】

特に、本実施形態の測定デバイス 1 0 では、連通管 1 5 a および 1 5 b が、流路 9 (すなわちウェル 1 9) を対称軸としてほぼ線対称に配置されている。このことによって、ウェル 1 9 内に生じる電解質溶液 1 2 の局所的流れを、連通管 1 5 a と連通管 1 5 b との間で双方向 (つまり、微小電極 1 から見て左右方向) に生じさせることが可能である。

【0094】

10

20

30

40

50

さらに、図3に示すように、連通管15aおよび連通管15bは、連通管15aおよび連通管15bがそれぞれ流路9(すなわちウェル19)に対してなす角度をとると、は必ず鈍角になるように配置されている。このことによって、ウェル19内に生じる電解質溶液12の局所的流れが必ず微小電極1に向かう方向に生じる。

【0095】

以上の説明からわかるように、本実施形態の測定デバイス10では、ウェル19内において、電解質溶液12の局所的流れを水平面内で2次的に生じさせることができる。

【0096】

また、本実施形態では、連通管15aおよび15bが流路9(すなわちウェル19)を対称軸としてほぼ線対称に配置されていることによって、連通管15aおよび15b内にある気液界面に働くそれぞれの界面張力の差の計算が非常に単純化される。

10

【0097】

さらに、本実施形態では、抵抗槽6aおよび6bもまた、連通管15aおよび15bと同様に流路9(すなわちウェル19)を対称軸としてほぼ線対称に配置されている。このことによって、抵抗槽6aおよび6b(あるいは連通管15aおよび15b)内にある気液界面に働くそれぞれの界面張力の差の計算がさらに単純化される。このため、上記の界面張力の差を非常に容易に調節することができる。

【0098】

さらにまた、本実施形態の測定デバイス10では、基準電極2は、基板16に形成された流路9の入口7の近傍に配置されている。しかしながら、基準電極2は、流路9に電解質溶液12が満たされたときに、電解質溶液12に接触する位置に設けられていればよい。特に、正確な測定を行なうためには、基準電極2を電解質溶液12の局所的流れが生じるウェル19の外部に設けることが好ましい。

20

【0099】

次に、本実施形態の測定デバイス10の使用例を説明する。

【0100】

(使用例1:電流で刺激された細胞の活動電位の測定)

従来のガラス微小ピペットを用いた細胞内記録法と同様に、本実施形態の測定デバイス10は、電圧固定法および電流固定法によって細胞の発する電気信号を測定することが可能である。

30

【0101】

具体的には、上述のように細胞21を微小電極1に誘導して、微小電極1を細胞21に刺入し、基準電極2に対する微小電極1の電位を測定部33において測定する。

【0102】

また、測定部33内に電流パルス発生器を設置しておき、これに微小電極1を接続しておく。そして、端子4aを通じて微小電極1から細胞21に電流刺激を与える。このことによって、電流刺激による細胞の脱分極および一過性の活動電位などを計算機35で計測することができる。

【0103】

(使用例2:薬剤投与によって刺激された細胞の膜電位測定)

40

本実施形態の測定デバイス10はまた、細胞のイオンチャネル特性を測定するために用いることができる。これは、入口コネクタ13(空洞7)および出口コネクタ14(空洞8)、ならびにこれらに連結されているポンプ31および32によって、細胞21に、神経刺激物質、化学シナプス伝達物質などの化学物質を投与することにより実施される。

【0104】

あるいは、薬剤は、圧電素子を用いたインクジェット法、精密な圧力ポンプまたはマイクロ流体駆動装置を用いた方法、特開平10-337177号公報に開示された方法、エレクトロポレーション法などによっても注入することができる。

【0105】

例えば、エレクトロポレーション法は、薬剤リザーバーと薬剤注入を注入する標的との

50

間にDCパルスを印加して所望の量を注入する方法である。具体的には、流路9に電解質溶液12を満たし、ウェル19内の電解質溶液12中に細胞21と薬剤とを添加した後、基準電極2と微小電極1との間にDCパルスを印加することによって、所望量の薬剤をウェル19内の細胞21に注入できる。

【0106】

本実施形態では、微小電極1は、ウェル19の壁面に設けられているが、底面に配置されていてもよい。

【0107】

また、本実施形態では、1つの基準電極2に対して、ウェル19内に微小電極1が複数個設けられていてもよい。微小電極1が複数個設けられている場合、複数の微小電極1が1つの端子4aに接続されていてもよいし、複数の微小電極1のそれぞれが、複数の端子に接続されていてもよい。但し、微小電極1が複数個設けられている場合、基準電極2の表面積が、複数の微小電極1の表面積の合計よりも大きいことが好ましい。これは、溶液流れなどの外乱に対する測定の安定性が向上するからである。

【0108】

ウェル19内に微小電極1が複数個設けられている場合、細胞21をそれぞれの微小電極1に固定し、全細胞を同時に測定することも、各細胞を別々に測定することも可能である。特に、生体試料である細胞は必ずしも生きていたとは限らない。そこで、本実施形態の測定デバイス10において、ウェル19内に微小電極1が10個設けられている構成であれば、例えば、細胞の生存率が90%である場合、一度の測定で確率的にほぼ9個の細胞のデータが得られる。従って、測定効率の向上にも効果がある。

【0109】

本実施形態では、上記コネクタ13および14は、接着剤などによって基板16に接着しているが、これに限定されず、基板16と一体成形されていてもよい。

【0110】

基板16および基板17として用いられる材料は、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料、SOI(シリコン・オン・インシュレータ)などに代表されるこれら半導体材料の複合素材；ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、セラミクス、フォスフェライト、感光性ガラスなどの無機材料；ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンなどの有機材料；ノボラック樹脂をベース樹脂とするノボラック樹脂-ジアゾナフトキノン(DNQ)系感光材料；ポリメチルメタクリレート(PMMA)およびPMMAとの共重合体、ポリメチレンスルホン、ポリヘキサフルオロブチルメタクリレート、ポリメチルイソプロピルケトン(PMIK)、ポリジメチルシロキサン(PDMS)；および環化ポリイソブレンをベースポリマーとするアジド化合物、例えば、2-6-ジ(4-ジドベザール)-4-メチルシクロヘキサノンなどから構成される感光材料群；を含むがこれらに限定されない。これらの中では、アモルファスシリコン、単結晶シリコン、またはガラスが基板16および基板17として好適に用いられる。

【0111】

なお、流路9を構成する基板16の凹部9aおよび基板17のウェル19の表面は、親水性処理が施されていることが好ましい。このことによって、微小な流路9内に液体を流すことができる。

【0112】

微小電極1および基準電極2は、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、水銀、タンゲステンおよびそれらの化合物などの貴金属材料；およびグラファイト、グラシー

10

20

30

40

50

カーボン、パイロリティックグラファイト、カ - ボンペ - スト、カ - ボンファイバ - に代表される炭素材料などの電極材料から作製されるが、これらに制限されるわけではない。なお、微小電極 1 および基準電極 2 は導電性高分子によって被覆されていてもよい。このことによって安定な固定化電極を作製することができる。また、これらの電極を単分子膜によって被覆することも可能である。

#### 【 0 1 1 3 】

薄膜抵抗体 3 a および 3 b は、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、水銀、タングステン、ニッケル、チタンおよびそれらの化合物などの貴金属材料；グラファイト、グラシーカーボン、パイロリティックグラファイト、カ - ボンペ - スト、カ - ボンファイバ - に代表される炭素材料；Si、Ge、ZnO、CdS、TiO<sub>2</sub>、GaAs、チタンなどの材料から作製され得るが、これらに制限されるわけではない。なお、上記の微小電極 1 および基準電極 2 と同様に、薄膜抵抗体 3 a および 3 b は、導電性高分子によって被覆されてもよく、これによって安定な薄膜抵抗体を作製することができる。また、この抵抗体は、単分子膜によって被覆することもできる。

10

#### 【 0 1 1 4 】

本実施形態では、抵抗槽 6 a および 6 b は、空気が充填されている。しかしながら、空気に限定されず、電解質溶液 1 2 との間で界面張力に変化を生じさせることが可能な気体および液体であれば用いることが可能である。

#### 【 0 1 1 5 】

なお、本実施形態では、薄膜抵抗体 3 a および 3 b を抵抗槽 6 a および 6 b に配置しているが、連通管 1 5 a および 1 5 b に配置しても、本実施形態の測定デバイス 1 0 を全く同様に動作させることが可能である。また、薄膜抵抗体 3 a および 3 b は、くし型形状であることが好ましい。このことによって、狭い領域でも第 1 および第 2 抵抗体を長さを大きくでき、抵抗値を大きくすることが可能となる。

20

#### 【 0 1 1 6 】

また、本実施形態では、ポンプ 3 1 および 3 2 を用いているが、これに限られず、ポンプ 3 1 および 3 2 のそれぞれに代えてシリンジを用いてもよい。

#### 【 0 1 1 7 】

(実施形態 2)

本実施形態では、上記実施形態 1 の測定デバイス 1 0 において、測定セル 1 1 に代えて用いることができる測定セル 1 1 ' を図を参照しながら説明する。なお、説明の簡素化を図るために、上記実施形態 1 と共通する構成要素を同一の参照符号で示す。

30

#### 【 0 1 1 8 】

本実施形態の測定セル 1 1 ' は、外観上は上記実施形態 1 の測定セル 1 1 とほぼ同じである。そこで、本実施形態では、図 1 に示す測定セル 1 1 を、測定セル 1 1 ' と置き換えて説明する。

#### 【 0 1 1 9 】

図 7 は、図 1 中に示した III - III 線に沿った断面図である。図 8 は、図 1 中に示した矢印 A から見た測定セル 1 1 ' の透視図である。なお、図 8 中に示す III - III 線に沿った断面図は、図 7 の断面図に相当する。また、図 8 では、測定セル 1 1 ' のうちの基板 1 6 の図示を省略している。

40

#### 【 0 1 2 0 】

測定セル 1 1 ' は、上記実施形態 1 の測定セル 1 1 とほぼ同じ構造である。但し、図 7 および図 8 に示すように、ウェル 1 9 (すなわち流路 9) に接続された連通管 1 5 c と、連通管 1 5 c に接続されている抵抗槽 6 c と、抵抗槽 6 c 内に配置された薄膜抵抗体 3 c とが設けられている点異なる。

#### 【 0 1 2 1 】

このため、本実施形態の測定セル 1 1 ' では、ウェル 1 9 内において、電解質溶液 1 2 の局所的流れを水平面内で前後左右 (つまり、2 次元的に完全に自由) に生じさせることができる。従って、本実施形態の測定セル 1 1 ' を用いれば、上記実施形態 1 の測定セル

50

11を用いるよりも、電解質溶液12内に含まれる生体試料21の位置制御を自由に行なうことができる。

【0122】

さらに、電解質溶液12内に含まれる生体試料21の位置制御の自由度が高くなるので、微小電極1をウェル19内に自由に設けることができる。つまり、ウェル19内の設計の自由度が向上する。

【0123】

本実施形態の測定セル11では、微小電極1に対向してウェル19（すなわち流路9）に接続された連通管15cと、連通管15cに接続されている抵抗槽6cと、抵抗槽6c内にそれぞれ配置された薄膜抵抗体3cとが設けられているので、ウェル19内に生じる電解質溶液12の局所的流れが微小電極1に向かう方向に生じさせることが可能である。

10

【0124】

また、図8に示すように、連通管15aおよび連通管15bは、それぞれ流路9（すなわちウェル19）に対してなす角度をとすると、角度は必ず鋭角になるように配置されている。つまり、連通管15aに沿って延びる直線と、連通管15bに沿って延びる直線とが微小電極1に向かって開くように、連通管15aおよび連通管15bが配置されている。このことによって、ウェル19内に生じる電解質溶液12の局所的流れが必ず微小電極1から遠ざかる方向に生じさせることが可能である。

【0125】

さらに、連通管15aおよび15bが、流路9（すなわちウェル19）を対称軸としてほぼ線対称に配置されている。このため、ウェル19内に生じる電解質溶液12の局所的流れを、連通管15aと連通管15bとの間で双方向（つまり、微小電極1から見て左右方向）に生じさせることが可能である。

20

【0126】

以上の説明からわかるように、本実施形態の測定セル11'は、図8に示すように、非常に対称性の高い構造を有しているので、抵抗槽6a、6bおよび6c（あるいは連通管15a、15bおよび15c）内にある気液界面に働くそれぞれの界面張力の差の計算が単純化される。このため、上記の界面張力の差を容易に調節することができる。

【0127】

特に、本実施形態の測定セル11'において、連通管15aおよび連通管15bがそれぞれ流路9（すなわちウェル19）に対してなす角度は、ほぼ60°であり、連通管15cが微小電極1に対向して設けられていることが好ましい。このことによって、抵抗槽6a、6bおよび6c（あるいは連通管15a、15bおよび15c）内にある気液界面に働くそれぞれの界面張力の差の計算が最も単純化される。このため、上記の界面張力の差を非常に容易に調節することができる。

30

【0128】

なお、本実施形態では、互いに異なる3方向に延びる連通管とそれらに接続された各抵抗槽および各抵抗体を設ける構成としているが、さらに上記3方向とは互いに異なる方向に延びる連通管とそれに接続された抵抗槽および抵抗体を追加して設けてもよい。このことによって、追加した連通管が延びる方向に、生体物質21を容易に誘導することができる。つまり、生体物質21を容易に誘導することができる方向が増える。このため、生体物質21の微小電極1への誘導をより精密に行なうことが可能になる。

40

【0129】

（実施形態3）

図9は、本実施形態の測定デバイスの構成を示す図である。

【0130】

図9に示すように、本実施形態の測定デバイス10'は、上記実施形態1または2の測定デバイス10と同様に、測定セル11または11'を備える。特に、本実施形態の測定デバイス10'では、測定セル11または11'が複数設けられており、複数の測定セル11または11'がマトリクス状に集積化されている。測定セル11または11'の構成

50

は、それぞれ上記実施形態 1 または実施形態 2 と全く同じである。

【0131】

各測定セル 11 または 11' が備える入口コネクタ 13 および出口コネクタ 14 は、バルブおよびポンプを備えた流路切替器 38 に連結されている。流路切替器 38 によって、入口コネクタ 13 を出口として、出口コネクタ 14 を入口として、交換可能に用いることも可能な構成となっている。

【0132】

さらに、本実施形態の測定デバイス 10' では、各流路切替器 38 に接続された流体駆動装置 41a および 41b、ならびに 42a および 42b が設けられている。流体駆動装置 41a および 41b、ならびに 42a および 42b としては、例えば、ポンプ、空気圧縮機、シリンジなどが用いられる。

10

【0133】

また、本実施形態の測定デバイス 10' では、電流印加部 18 および測定部 33 は、マルチプレクサ 36 および 37 によりそれぞれスイッチング可能であるように構成されている。電流印加部 18、測定部 33、マルチプレクサ 36 および 37 の動作は、電流印加部 18 および測定部 33 に接続された計算機 35 で制御される。

【0134】

本実施形態の測定デバイス 10' によれば、同時に複数の測定を行なうことが可能である。

【0135】

(実施形態 4)

本実施形態では、上記実施形態 1 の測定デバイス 10 を用いて行なう測定方法を図 10 を参照しながら説明する。図 10 は、本実施形態の測定方法を表すフローチャートである。

20

【0136】

まず、図 10 に示すように、ステップ St 1 において、上記実施形態 1 で述べた層流を利用する方法でウェル 19 内に細胞 21 を導入し、細胞 21 の位置を制御して微小電極 11 に固定した後、細胞内電位を測定する。

【0137】

次に、図 10 に示すように、ステップ St 2 において、バルブ V を切り替えて入口コネクタ 13 から刺激剤溶液を流路 9 に注入する。刺激剤溶液がウェル 19 上に到達したときに、刺激剤溶液の注入を停止し、流路 9 内の液体の流れを止める。このことによって、刺激剤はウェル 19 内に拡散し、微小電極 11 に固定された細胞 21 が刺激される。

30

【0138】

次に、図 10 に示すように、ステップ St 3 において、再度、細胞内電位を測定する。

【0139】

次に、図 10 に示すように、ステップ St 4 において、ウェル 19 内を洗浄する。具体的には、バルブ V を切り替えて入口コネクタ 13 から洗浄液を流路 9 に注入し、洗浄液がウェル 19 上に到達したときに、洗浄液の注入を停止する。このことによって、洗浄液がウェル 19 内に拡散する。続いて、洗浄液を出口コネクタ 14 から排出する。特に本ステップでは、洗浄液の注入および排出の操作を繰り返す。このことによって、ウェル 19 内

40

【0140】

次に、図 10 に示すように、ステップ St 1 ~ 4 を、刺激剤溶液における刺激剤の濃度を順次増大させながら繰り返す。このことによって、刺激剤の濃度と細胞内電位との相関関係を調査することができる。

【0141】

また、上記ステップ St 2 の前に、予め拮抗剤を、刺激剤と同様の手順でウェル 19 内に導入しておくことによって、拮抗剤と細胞内電位との相関関係を調査することも可能である。

50

## 【0142】

以下に、本発明の実施例を説明する。以下に述べる実施例は、本発明の例示であり、本発明を制限するものではない。

## 【0143】

## 実施例

ここでは、上記実施形態1の測定デバイス10を用いて、生体試料として単離細胞を測定する場合の実施例について説明する。

## 【0144】

## (実施例1)

## 測定デバイスの製作

基板16の材料として2mm厚のガラス板を用いた。幅60mm×長さ100mmのガラス板の表面に、100 $\mu$ mのエンドミルを使い、幅150 $\mu$ m、長さ3mm、深さ70 $\mu$ mの凹部9aを形成した。その後、凹部9aを丹念に研磨した。凹部9aの両端に入口および出口となる直径1.5mmの貫通穴をあけた。

## 【0145】

基板17の材料として単結晶シリコンウェハを用いた。基板17の表面に、フォトリソグラフィおよび異方性エッチングを用い、幅150 $\mu$ m、長さ500 $\mu$ m、深さ30 $\mu$ mの逆台形型のウェル19、幅400 $\mu$ m、長さ1000 $\mu$ m、深さ30 $\mu$ mの逆台形型の抵抗槽6aおよび6b、幅10 $\mu$ m、長さ500 $\mu$ m、深さ7.1 $\mu$ mの逆三角柱型の連通管15aおよび15bを形成した。具体的な製作工程は以下に述べるとおりである。

## 【0146】

単結晶シリコンウェハを120 $^{\circ}$ で20分間ベイクした後、十分脱水し、その表面にフォトレジストを1000rpmで5秒間スピコートして成膜した。その後、この基板を90 $^{\circ}$ で10分間プリベイクし、ウェルを露光によりマスクパターンし、専用現像液を用いて現像および洗浄し、ウエットエッチングによりウェル19および抵抗槽6aおよび6bおよび連通管15aおよび15bを完成した。ここでは、24wt% KOH、および界面活性剤であるIPA(イソプロピルアルコール)の混合溶液をエッチャントとして用いた。この混合溶液を、循環ポンプを用いて循環し、そして溶液温度を73 $\pm$ 3 $^{\circ}$ Cに制御した状態で35分エッチングを行った。

## 【0147】

微小電極1は、単結晶シリコンを材料とし、円形エッチングマスク直下でアンダーエッチングして作製した。微小電極は、先端が尖った略円錐形状となり、その外周面が凹み方向へ湾曲し、先端近傍径がほぼ1 $\mu$ m、底面部の直径がほぼ16 $\mu$ m、高さほぼ8 $\mu$ mであった。その後、微小電極表面を、タングステンをスパッタにて成膜した後、先端部を残して、ポリイミドで絶縁被覆した。

## 【0148】

その後、基板17に、薄膜抵抗体3aおよび3b、ならびにその引出し配線、基準電極2およびその引出し配線、ならびに微小電極1からの引出し配線を製作した。簡単に述べれば、基板17に真空蒸着法により0.5 $\mu$ m厚の白金膜を形成した。その後、フォトリソグラフィによって、白金膜のうち、上記の電極、抵抗体および配線以外の部分を除去した。なお、配線は80 $\mu$ m幅、薄膜抵抗体3aおよび3bは25 $\mu$ m幅を有するくし型形状とした。

## 【0149】

ここで、基板16と基板17とを陽極接合により接合し、閉じた流路9を形成した。陽極接合は、400~600V、600Vの直流電圧を10分間印加する条件で行った。その後、入口コネクタ13および出口コネクタ14を、基板16の凹部9aの両端に形成した貫通穴に接続した。次いで、流路9の出口に接続されたコネクタに、3方コックおよびフィッティングジョイントを介してコンプレッサーを接続した。

## 【0150】

## (実施例2)

10

20

30

40

50

### 神経細胞の活動電位の測定

測定デバイス10の流路9の出口コネクタ14側を、大気圧よりわずかに低い圧力になるように減圧し、入口コネクタ13に連結されたペルスタティックポンプを用い、モノアラガイ用培地(4.0 mM NaCl、1.7 mM KCl、4.1 mM CaCl<sub>2</sub>、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM グルコース、5 mM HEPES、pH 7.9)を、入口コネクタ13から10 μl/分~100 μl/分の流速で流路9に注入した。このとき、連通管15aおよび15bを通過して抵抗槽6aおよび6b内に培地が入っていくのが観測された。

#### 【0151】

ここで、モノアラガイ用培地が出口コネクタ14まで注入されたことを確認した後、出口コネクタ14側からの減圧操作を止め、三方コックを解放し出口コネクタ14側を大気圧に戻した。このとき、連通管15aおよび15bにはさらに培地が流れ込み、連通管15aおよび15bと抵抗槽6aおよび6bとの接続部位に気液界面が位置するようになった。

10

#### 【0152】

モノアラガイより摘出した神経節を、1 mg/mlのProtease Type 14 (SIGMA、P-5147)溶液中で37℃25分間振とうし、神経細胞を単離させた。得られたモノアラガイ神経細胞を、モノアラガイ用培地に懸濁し、入口コネクタ13から注意深く流路9に導入した。そして、顕微鏡下で流路9を観察し、モノアラガイ神経細胞がウェル19の上方に到達した瞬間に、入口コネクタ13および出口コネクタ14に連結されたバルブVを閉めたところ、神経細胞がウェル19内に導入されたことを確認した。

20

#### 【0153】

次いで、薄膜抗体3aおよび3bに、10 mA p-p (ミリアンペア ピーク トウ ピーク)を30秒間印加したところ、神経細胞はウェル19内を移動して微小電極1に突き刺さった。ここで、微小電極1に10 nA p-pで1ミリ秒間矩形波電流刺激パルス印加し、膜電流固定法により細胞内電位を測定した。細胞内電位は、310ミリ秒を1区間として60回分、サンプリング周波数50 kHzで記録した。

#### 【0154】

次に、電流刺激を、8 nA p-p、1ミリ秒の矩形波電流刺激を印加することにより測定を行った。3回の測定結果を図11に示す。なお、本実施例の測定は全て、ブリッジバランスを取り、デバイス容量の補正を施した。また、測定データは、5 kHz 四次バタワース型ローパスフィルタを通した後、計算機に取り込まれようにした。

30

#### 【0155】

図11に示すように、150ミリ秒から250ミリ秒の間に電流刺激による細胞の電位応答が観測され、従来の細胞内記録法によるものと同様に神経細胞の活動電位が検出されることが示された。

#### 【0156】

(実施例3)

生体試料21としてラット動脈由来の平滑筋(SM)を用いた。測定デバイス10内に注入する溶液として、10% FBS (Fetal Bovine Serum)を添加したDMEM培地を使用した。実施例2と同様の操作を行うことにより平滑筋細胞を微小電極1に刺し、アセチルコリンのアナログである、Carbacholを100 μMの濃度の溶液として導入したときの、膜電流固定法による細胞内電位を測定した。

40

#### 【0157】

Carbacholを投与したときに計測された自発性の活動電位を測定した結果を図12に示す。図12に示されるように、Carbacholに反応する活動電位が検出された。これは、従来の細胞内記録法によるものと同様の測定結果である。

#### 【0158】

さらに、図13に、細胞内記録法によるデータに、信号処理を加えたときの10ミリ秒

50

毎の標準偏差値のヒストグラムを示す。図13はCarbachol投与前後の10ミリ秒毎の標準偏差値のヒストグラムである。Carbachol投与前後のヒストグラムを正規分布により近似して求めたグラフの平均値および半値幅は、投与前では0.185および0.04、投与後では0.545および0.21であり、Carbachol投与前後で、10ミリ秒毎の偏差値の平均値が増加していることがわかる。これはCarbacholを投与することによって、モノアラガイ神経細胞のイオンチャンネルが活性化され、その活性化されたチャンネルの開閉によるコンダクタンスの変動が電圧変化として表されているためである。図13から、測定デバイス10は、従来の細胞内記録法によるものと同様に、神経刺激物質に対するイオンチャンネル特性が決定できることがわかった。

【0159】

10

このように、測定デバイス10では、従来の細胞内記録を行わずに、イオンチャンネル活性度抽出方法により、簡便にチャンネルの開閉に伴う細胞活動を測定することができる。従って、測定デバイス10を用いて、細胞への薬物投与の前後またはその投与量に対するチャンネル活性度の絶対値やチャンネル活性度の増減を比較することによって、細胞チャンネル活性度の測定や、薬物の作用効果の定性的または定量的な分類を行うことが可能となる。

【0160】

以上に述べた実施例2および3の結果から、測定デバイス10は、微小電極1に誘導された細胞21から、細胞膜電位および一過性の活動電位を微小電極1によって高感度に取り得ることが可能であることがわかる。

20

【0161】

以上に説明したように、本発明によれば、簡易で、正確、高速かつ自動的に、生体試料の電気生理学的評価を行なうことが可能な測定デバイスが提供される。

【産業上の利用可能性】

【0162】

本発明の測定デバイスおよび測定方法は、薬品スクリーニング等に代表される生体試料の電気生理学的評価を行なうために利用される。

【図面の簡単な説明】

【0163】

【図1】実施形態1の測定デバイスの構成を示す図である。

30

【図2】図1中に示したIII-III線に沿った断面図である。

【図3】図1中に示した矢印Aから見た測定セルの透視図である。

【図4】(a)、(b)および(c)は、実施形態1の測定デバイスの動作を模式的に示す図である。

【図5】図1中に示した矢印Aから見た測定セルの透視図である。

【図6】(a)および(b)は、細胞を電極に導く原理の概略を示す模式図である。

【図7】実施形態2の測定デバイスの構成を示す図である。

【図8】図1中に示したIII-III線に沿った断面図である。

【図9】図1中に示した矢印Aから見た測定セルの透視図である。

【図10】実施形態4の測定方法を表すフローチャートである。

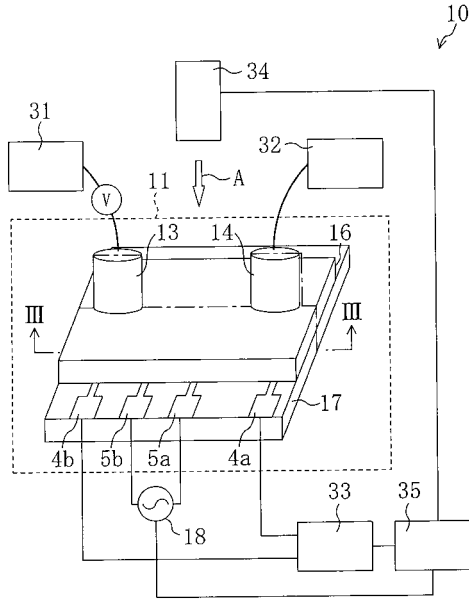
40

【図11】実施形態1の測定デバイスを用いて測定した、電流刺激印加時のモノアラガイ神経細胞の活動電位を示す図である。

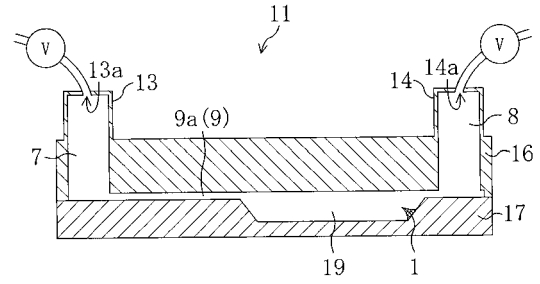
【図12】実施形態1の測定デバイスを用いて測定した、カルバコール滴下時の平滑筋細胞の活動電位を示す図である。

【図13】実施形態1の測定デバイスを用いて測定した、カルバコール滴下前後の平滑筋細胞の活動電位を、10ミリ秒毎の標準偏差値のヒストグラム表示した図である。

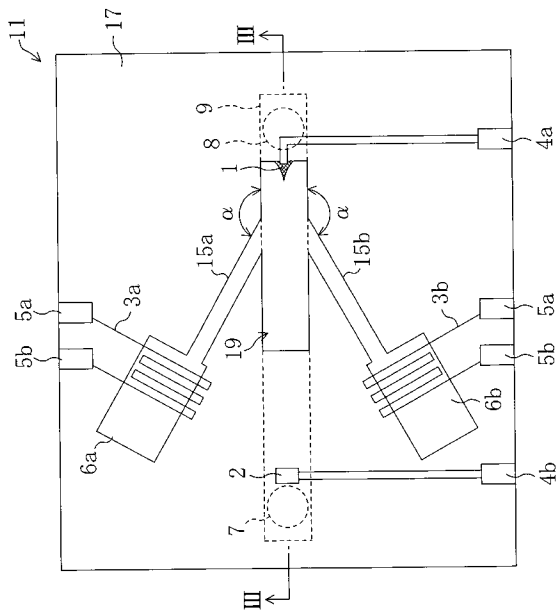
【 図 1 】



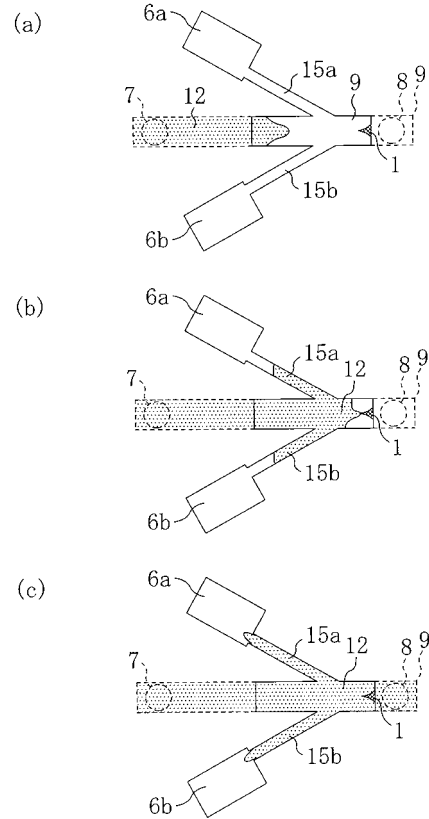
【 図 2 】



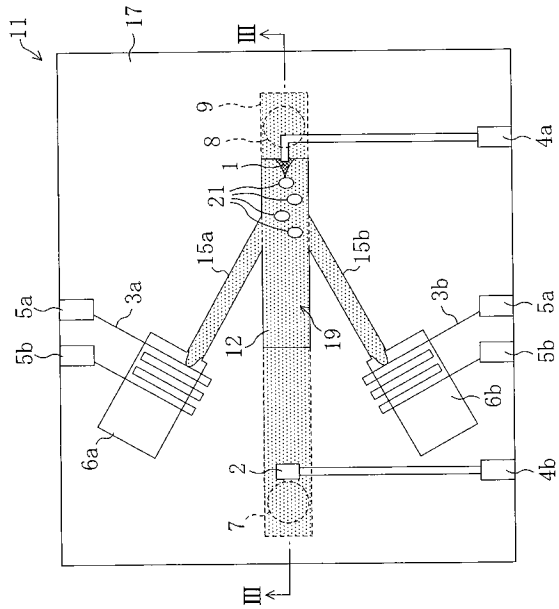
【 図 3 】



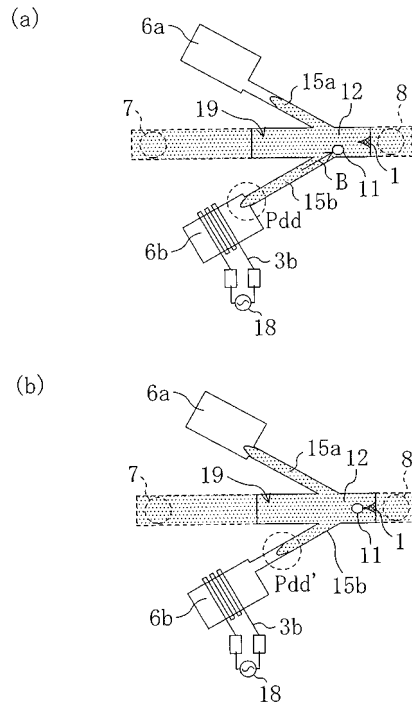
【 図 4 】



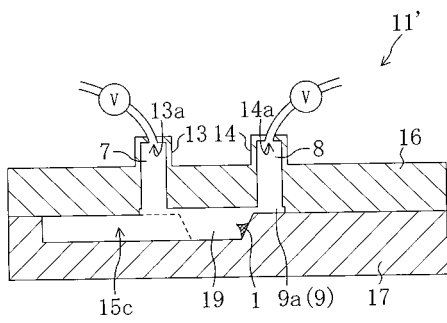
【 図 5 】



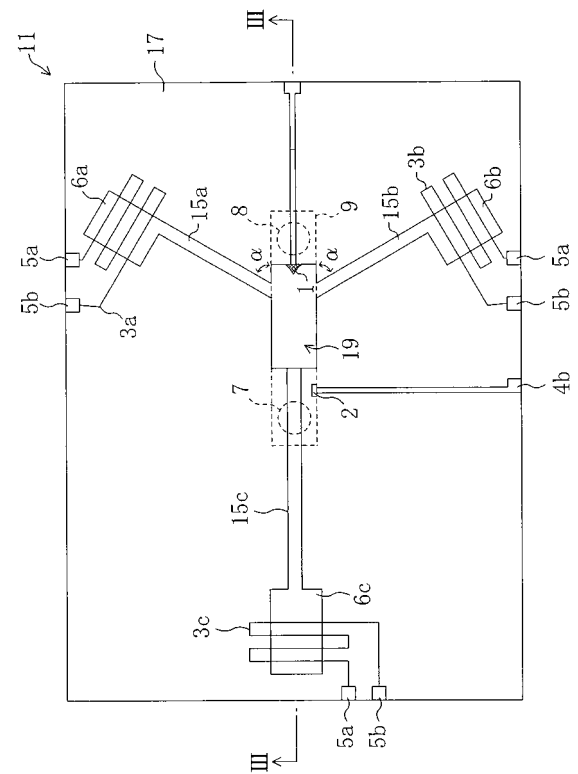
【 図 6 】



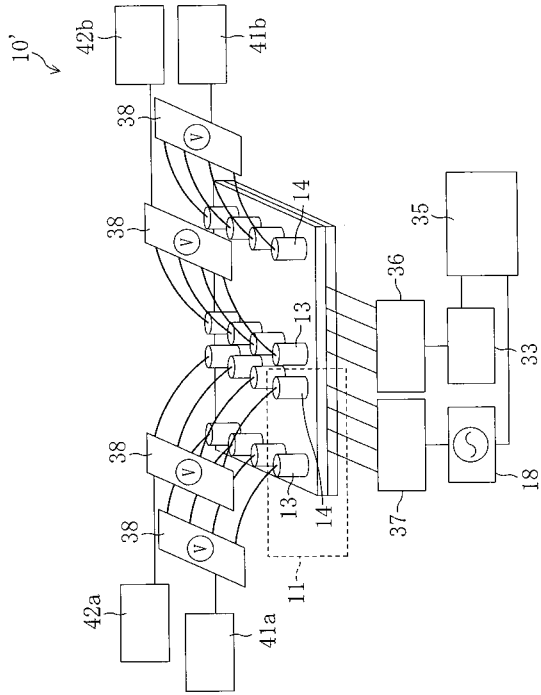
【 図 7 】



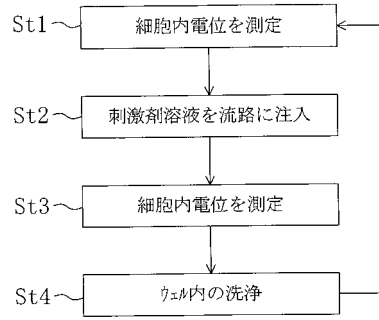
【 図 8 】



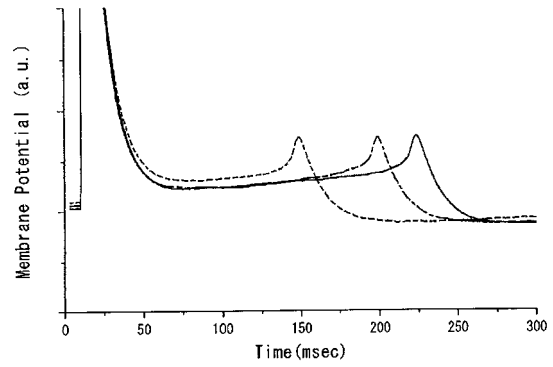
【 図 9 】



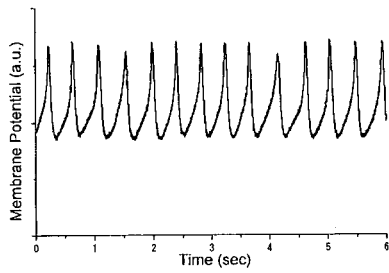
【 図 10 】



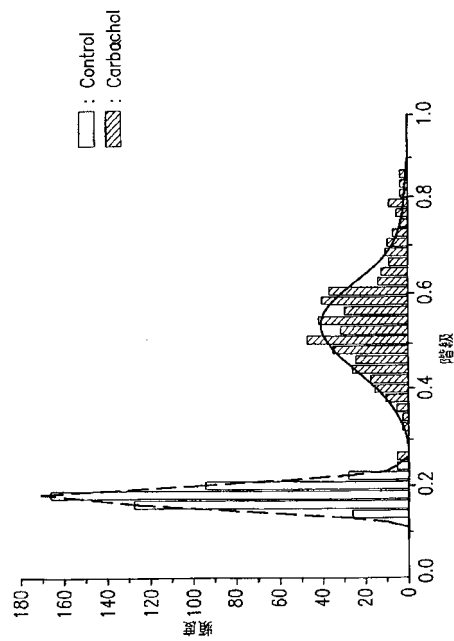
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 13 】



---

フロントページの続き

- (74)代理人 100115691  
弁理士 藤田 篤史
- (74)代理人 100117581  
弁理士 二宮 克也
- (74)代理人 100117710  
弁理士 原田 智雄
- (74)代理人 100121728  
弁理士 井関 勝守
- (72)発明者 尾崎 亘彦  
日本国奈良県生駒市青山台342-6
- (72)発明者 岡 弘章  
日本国大阪府枚方市中宮北町3-10-913
- (72)発明者 杉原 宏和  
日本国大阪府交野市幾野1-10-630

審査官 谷垣 圭二

- (56)参考文献 特開平9-289886(JP,A)  
特開平9-211010(JP,A)  
特開平11-299496(JP,A)  
特開2001-193329(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 27/28  
G01N 37/00